

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 2 月 10 日 (10.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/012529 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/56, 5/10, C12P 19/04, A01H 5/00, C08B 37/08, A61K 31/728 堅田 2 丁目 1 番 1 号 株式会社東洋紡総合研究所内 Shiga (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/011306 (74) 代理人: 三枝 英二 . 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2004 年 7 月 30 日 (30.07.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ:  
特願2003-204896 2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003) JP  
特願2004-089135 2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社東洋紡総合研究所 (TOYOBO RESEARCH CENTER CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 柴谷 滋郎 (SHI-BATANI, Shigeo) [JP/JP]; 〒5200292 滋賀県大津市堅田 2 丁目 1 番 1 号 株式会社東洋紡総合研究所内 Shiga (JP). 三澤 修平 (MISAWA, Shuhei) [JP/JP]; 〒5200292 滋賀県大津市堅田 2 丁目 1 番 1 号 株式会社東洋紡総合研究所内 Shiga (JP). 猪原 泉 (IHARA, Izumi) [JP/JP]; 〒5200292 滋賀県大津市堅田 2 丁目 1 番 1 号 株式会社東洋紡総合研究所内 Shiga (JP). 北澤 宏明 (KITAZAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒5200292 滋賀県大津市
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PLANT PRODUCING HYALURONIC ACID

(54) 発明の名称: ヒアルロン酸生産植物

(57) Abstract: A method of synthesizing hyaluronic acid which comprises: (1) the step of transforming a plant cell or a plant by (i) a DNA encoding hyaluronate synthase, or (ii) a DNA encoding a polypeptide that has an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of hyaluronate synthase by deletion, substitution, addition or insertion of one or more amino acids and having an activity of synthesizing hyaluronic acid; (2) the step of growing the transformant obtained by the transformation; and (3) the step of separating the hyaluronic acid thus produced.

(57) 要約: 本発明は、(1) (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA で植物細胞又は植物体を形質転換する工程、(2) 該形質転換した形質転換体を生育する工程、(3) 生産されたヒアルロン酸を分離する工程を有する、ヒアルロン酸の合成方法に関する。

WO 2005/012529 A1

## 明細書

## ヒアルロン酸生産植物

## 技術分野

本発明は、植物によりヒアルロン酸を製造する方法、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物  
5 細胞又は形質転換植物およびそれらの作製方法に主に関する。

## 背景技術

植物は、光合成を利用して水と二酸化炭素から糖を合成する、エネルギー負荷の低い理想的な糖質生産系である。一部の生物を除いて、他の生物では糖を自身で合成することができず、植物由来の糖を利用している。一方、植物由来の糖を原料として、糖を修飾したり、糖鎖を伸長し  
10 糖質を合成する能力は動物・微生物それぞれ独自に有しており、植物が生産することができない動物・微生物由来の糖誘導体や糖質もある。植物において生産不可能とされ、動物・微生物が生産している糖質としてヒアルロン酸が挙げられる。

ヒアルロン酸は、1934年にMeyerとPalmerが、牛の眼球の硝子体から単離したグリコサミングリカン(ムコ多糖)である(Meyer, K. and Palmer, J. W. (1934) J. Biol. Chem., 107, 629-634)。彼らは、  
15 この物質がグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンが $\beta$ -1,3および $\beta$ -1,4結合した二糖の繰り返し構造を有する直鎖状の多糖であることを示した(Weissman, B. and Meyer, K. (1954) J. Am. Chem. Soc., 76, 1753-1757)。

その後、1950～1960年代に、ヒアルロン酸生合成に関する研究がA群連鎖球菌を用いた無細胞系実験により行われ、ヒアルロン酸鎖の伸長にウリジン-5'-ジホスホグルクロン酸(以下、UDP-  
20 グルクロン酸またはUDP-GlcAとすることがある)およびウリジン-5'-ジホスホ-N-アセチルグルコサミン(以下、UDP-N-アセチルグルコサミンまたはUDP-GlcNAcとすることがある)の2種類の糖ヌクレオチドを用いることにより、連鎖球菌細胞膜に局在するヒアルロン酸合成酵素の活性が示された(Markovitz, M., Cifonelli, J. A. and Dorfman, A. (1959) J. Biol. Chem., 234, 2343-2350)。  
ヒアルロン酸合成酵素を安定な活性型として、可溶化して高純度に精製することは長年の間、困難であったが、1993年に、連鎖球菌のヒアルロン酸合成酵素遺伝子(*hasA*)が単離され  
(DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J. and Weigel, P. H. (1993) J. Biol. Chem., 268, 14568-14571)、それ以来、真核生物のヒアルロン酸合成酵素遺伝子のクローニングが報告され(Itano, N. and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem., 271, 9875-9878; Itano, N. and Kimata, K. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 222, 816-820; Spicer, A. P., Augustine, M. L. and McDonald, J. A.  
30 (1996) J. Biol. Chem., 271, 23400-23406; Spicer, A. P., Olson, J. S. and McDonald, J. A. (1997) J. Biol. Chem., 272, 8957-8961; Shyjan A. M., Heldin, P., Butcher E. C., Yoshino T. and Briskin, M. J. (1998) J. Biol. Chem., 271, 23395-23399; Watanabe, K. and Yamaguchi, Y. (1996) J. Biol. Chem., 271, 22945-22948)、さらに、クロレラウイルス PBCV-1(DeAngelis, P. L., Jing, W. Graves, M. V., Burbank, D. E. and van Etten, J. L. (1998) Science, 278, 1800-1804)やパステウレラ ムル  
35 トンダ由来(DeAngelis, P. L., Jing, W. Drake, R. R. and Achyuthan, A. M. (1998) J. Biol. Chem., 273, 8454-8458)のヒアルロン酸合成酵素遺伝子が見出され、活性型の組換え酵素が得られるようになった。

これらの研究の進展と共に、ヒアルロン酸の広範囲の生理機能が解明され、ユニークな物理化学的特性と生物学的な機能が明らかにされてきた。高分子のヒアルロン酸は、変  
40 形関節症の治療や眼科用手術補助剤、癒着防止や創傷治癒促進に使用されている。また、

低分子のヒアルロン酸は生理活性効果があることが報告されている。そして、バイオマテリアル素材や、新たな医療用途への応用も期待されている。

これまで、ヒアルロン酸は、動物組織からの抽出または微生物発酵により生産されてきた。しかしながら、動物組織からの抽出は、例えば狂牛病におけるプリオン、ウイルス等の混入の危険性が懸念されている。また、動物細胞は、細胞の維持管理が困難で高価な培地を必要とする上に増殖速度も遅い。一方、微生物発酵は、糖を含有する培地や設備投資のコストが問題である。また、大腸菌などでは、タンパク質のプロセッシングが起らない、インクルージョンボディ(封入体)を形成する可能性があり、プロテアーゼによる分解が生じるなどの問題がある(Petrides, D. et al. (1995) *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 529)。また、治療用物質を微生物で生産する場合は、エンドトキシンの混入などを防ぐために精製コストが非常に高くなる。

このような理由から、光合成により原料である糖を植物内で合成し、それらの糖を用いて、ヒアルロン酸を植物に生産させることができれば、安全面、コスト面等の点から、産業上特に有利と考えられる。

しかし、植物で、動物および微生物由来のタンパク質を発現させた例はあるものの(Giddings, G. et al. (2000) *Nat. Biotechnol.*, 18, 1151-1155; Daniell, H. et al. (2001) *Trends Plant Sci.*, 6, 219-226)、タンパク質が機能を持つために必要な高次構造や糖鎖構造が由来生物と異なるため、生産されるタンパク質が本来の機能を持たないことも多かった。例えば、タバコ培養細胞 BY-2 でエリスロポエチンを発現させたが *in vivo* で生理活性を持たなかった例などがある(Matsumoto, S. et al. (1995) *Plant Mol. Biol.*, 27, 1163-1172)。

また、従来の技術は、動物や微生物由来のタンパク質を植物で発現させて、そのタンパク質自体を抽出して利用することが主に行われており、植物に動物や微生物由来のタンパク質を発現させ、なおかつ植物内で発現しているタンパク質を利用して植物内で物質生産を行った例はほとんどなかった。

植物内での物質生産として、ヒト由来  $\beta$  1,4-ガラクトース転移酵素をタバコ培養細胞 BY-2 に導入した結果、従来から存在していた糖タンパク質の糖鎖に新たに  $\beta$  1,4 結合でガラクトースを結合させた報告がある(Palacios, N. Q. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4692-4697)。しかし、この反応は、糖転移酵素を用いて1種類の糖ヌクレオチドから1個の糖を転移させる反応であって、ヒアルロン酸のような2種類の糖ヌクレオチドを一定の順序で数十個あるいは数百個も転移させて高分子を生成する反応とは全く異なっている。

また、ヒアルロン酸合成酵素は、一般的に複数の膜貫通領域および膜結合領域を持っている。ヒアルロン酸合成酵素のような膜結合型タンパク質を、遺伝子を発現させる宿主と異なる由来の遺伝子を発現する場合は、膜貫通領域および膜結合領域が正しい構造を維持できないことが多い。例えば、活性型ヒアルロン酸合成酵素は、1つのヒアルロン酸合成酵素と膜に存在するリン脂質であるカルジオリピン約 14~18 分子とが複合体を形成し、ヒアルロン酸合成酵素活性に影響することが示唆されている(Tlapak-Simmons, V. L. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 4239-4245)。このように、植物内で植物が本来有していないヒアルロン酸合成酵素遺伝子を発現すること自体、想到困難であることが予測される。

このように、ヒアルロン酸を植物により生産する技術は有用性が高いと期待されるものの、ヒアルロン酸は植物が全く生産していない物質であり、このように植物がもともと生産しない物質を植物で

生産すること、しかも、ヒアルロン酸のような高分子の物質を生産することは、従来の技術からは到底困難と考えられていた。

本発明は、ヒアルロン酸合成酵素を植物内で発現し、植物では本来生産されないヒアルロン酸を、植物細胞又は植物を用いて生産させることを主な課題とする。

5

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒアルロニダーゼ処理液の HPLC の測定結果を示す。

図2は、RT-PCR の反応液のアガロース電気泳動の結果を示す。

10

#### 発明の開示

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA又はヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNAで、植物細胞又は植物を形質転換することにより、植物細胞又は植物においてヒアルロン酸合成活性酵素が発現し、更に、植物内でヒアルロン酸が生産されることを見出し、更に鋭意検討を重ねて、本発明を完成するに至った。

15

すなわち、本発明は、次の事項に係るものである。

項1. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換する工程、(2)形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3)該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を有する、ヒアルロン酸の製造方法。

20

項2. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換する工程、(2)形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3)該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を有する、ヒアルロン酸の製造方法。

25

項3. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞の作製方法。

30

項4. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物の作製方法。

35

項5. 発現用組換えベクターが、(1) (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA 及び(2)器官特異的又は組織特異的プロモーターを含む発現用組換えベクターであって、得られる形質転換植物が、器官特異的又は組織特異的ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物である、項4に記載の方法。

項6. ヒアルロン酸合成酵素が脊椎動物由来又は微生物由来ヒアルロン酸合成酵素である、項1～5のいずれかに記載の方法。

項7. ヒアルロン酸合成酵素がクロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成酵素である項1～5のいずれかに記載の方法。

- 5 項8. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換することにより得られるヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞。

- 10 項9. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換することにより得られる、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

- 15 項10. 植物体が、被子植物、裸子植物、シダ植物及びコケ植物からなる群から選ばれるいずれかの植物体である、項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

項11. 器官が、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂からなる群から選ばれる1種又は2種以上の器官である、項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

- 20 項12. 組織が、表皮、師部、柔組織、木部及び維管束からなる群から選ばれる1種又は2種以上の組織である、項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

- 25 項13. 発現用組換えベクターが、(1) (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNA 及び(2)器官特異的又は組織特異的プロモーターを含む発現用組換えベクターであって、得られる形質転換植物が、器官特異的又は組織特異的ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物である、項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

- 30 項14. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換することにより得られる、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物細胞。

- 35 項15. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換することにより得られる、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

項16. ヒアルロン酸合成酵素が脊椎動物由来又は微生物由来ヒアルロン酸合成酵素である、項8又は14に記載の形質転換植物細胞。

項17. ヒアルロン酸合成酵素が脊椎動物由来又は微生物由来ヒアルロン酸合成酵素である、項9～13、15のいずれかに記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

項18. ヒアルロン酸合成酵素がクロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成酵素である、項8又は14に  
5 記載の形質転換植物細胞。

項19. ヒアルロン酸合成酵素がクロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成酵素である、項9～13、15のいずれかに記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

項20. 項8又は14に記載の形質転換植物細胞或いは項9～13、15のいずれかに記載の形質  
10 転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織によって生産されたヒアルロン酸。

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明においては、ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又はヒアルロン酸合成酵素のアミ  
15 ノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を用いて、植物細胞又は植物体の形質転換を行う。

ヒアルロン酸合成酵素としては、UDP-グルクロン酸とUDP-N-アセチルグルコサミンを基質として、グルクロン酸とグルコサミンの繰り返し構造からなるポリマー構造のヒアルロン酸を合成する  
20 ものであれば、その由来は特に限定されない。例えば、ヒト、マウス、ラビット、ニワトリ、ウシ、アフリカツメガエル等の脊椎動物由来のヒアルロン酸合成酵素、ストレプトコッカス属、パスチュレラ属、クロレラウイルス等の微生物由来のヒアルロン酸合成酵素などを用いることができる。

これらのヒアルロン酸合成酵素のなかでも、クロレラウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素が特に好ましい。

25 ヒアルロン酸合成酵素の1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドは、ヒアルロン酸合成活性を失わない程度の変異がなされたポリペプチドであり、ヒアルロン酸合成酵素の一部且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドと、ヒアルロン酸合成酵素の欠失、付加、挿入又は置換体であって且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドの両方を含む。

30 ヒアルロン酸合成酵素の一部であって、且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドとは、上記のようなヒアルロン酸合成酵素においてヒアルロン酸合成活性を奏するために必須となるアミノ酸部位を含み、必須でない部分の一部は欠失し、かつヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドである。

ヒアルロン酸合成酵素の1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒ  
35 アルロン酸合成活性を有するポリペプチドの一例として、パスチュレラ ムルトシダ由来ヒアルロン酸合成酵素は、膜結合領域および膜貫通領域と思われる約 270 アミノ酸を欠失してもヒアルロン酸合成酵素活性をもつことが報告されている (Jing et al., 2000, Glycobiology, 10, 883-889)。

このような変異は、自然界において生じるほか、人為的な変異も含む。変異したアミノ酸の数は、ヒアルロン酸合成活性を失わない限り、その個数は制限されない。

本発明におけるヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又はヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA としては、上記ヒアルロン酸合成酵素又はポリペプチドをコードするものであれば特に限定されず、コドンの縮重により配列が異なるものも含まれる。

5 このようなDNAとして、公知のヒアルロン酸合成酵素遺伝子を適宜用いることができる。例えば、ヒト、マウス、ラビット、ニワトリ、ウシ、アフリカツメガエル、ストレプトコッカス属、パスチュレラ属、クロレラウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素遺伝子を用いることができる。

より具体的には、ヒト由来のヒアルロン酸合成酵素 (hHAS) 遺伝子の HAS1、HAS2 および HAS3、マウス由来のヒアルロン酸合成酵素 (mHAS) 遺伝子の HAS1、HAS2 および HAS3、ニワトリ由来のヒアルロン酸合成酵素 (gHAS) 遺伝子の HAS1、HAS2 および HAS3、ラット由来のヒアルロン酸合成酵素 (rHAS) 遺伝子の HAS2、ウシ由来のヒアルロン酸合成酵素 (bHAS) 遺伝子の HAS2、アフリカツメガエル由来のヒアルロン酸合成酵素 (xHAS) 遺伝子の HAS1、HAS2 および HAS3、パスチュレラ ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素 (pmHAS) 遺伝子、ストレプトコッカス ピオゲネス由来のヒアルロン酸合成酵素 (spHAS) 遺伝子、ストレプトコッカス エクイシミリス由来のヒアルロン酸合成酵素 (seHAS) 遺伝子、クロレラウイルス PBCV-1 (cvHAS) 由来の HAS 遺伝子などを用いることができる。

10

15

ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) 遺伝子には、HAS1、HAS2、HAS3 などの各種タイプを有するものがあるが、タイプの種類は特に限定されない。

このうち、クロレラウイルス由来の HAS 遺伝子が特に好ましい。

20 上記 (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組み換えベクターを用いて植物細胞又は植物体を形質転換することによって、本発明の形質転換体、換言すると、形質転換植物細胞又は形質転換植物が作製される。

25 本発明の形質転換植物細胞又は形質転換植物は、(i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を挿入した発現用組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入し、形質転換することにより得ることができる。

30 ここで、宿主とは、植物全体、種子、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)又は植物培養細胞のいずれをも意味するものである。

本明細書において、植物とは、種子植物、シダ植物、コケ植物、地衣植物等を含む、多細胞の植物を意味し、植物全体、種子、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)又は植物培養細胞のいずれをも包含するものである。

35 また、該形質転換して得られた形質転換体を培養し、該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離することにより、ヒアルロン酸が製造される。

発現用組換えベクターとしては、形質転換植物細胞又は形質転換植物作製のために通常用いられているベクターを用いることができる。

このようなベクターとしては、植物細胞で転写可能なプロモーター配列と転写産物の安定化に必要なポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列を含んでいれば特に制限はない。例えばプラスミド「pBI121」、「pBI221」、「pBI101」、「pG121Hm」などを用いることができる。

- 植物培養細胞を宿主として用いる場合は、形質転換は、植物培養細胞に、エレクトロポレーション法又はアグロバクテリウムのバイナリーベクター法もしくはパーティクルガン法で(i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を挿入した発現用組換えベクターを導入することにより行うことができる。発現ベクターを導入された植物細胞は、例えば、カナマイシン耐性などの薬剤耐性を基準として選
- 10 択される。形質転換された植物細胞は、細胞培養、組織培養、器官培養に用いることができ、また従来知られている植物組織培養法等を用いて、植物体を再生することもできる。

- 形質転換の対象となる植物細胞の例としては、例えば、タバコ由来 BY-2 細胞や T-13 細胞、ニンジン由来 kurodagosun 細胞、ブドウ由来 VR 細胞や VW 細胞、ヨウシュヤマゴボウ由来 PAR 細胞や PAP 細胞や PAW 細胞、シロイヌナズナ由来 T87 細胞、アスパラガス由来 Asp-86 細胞や A.per
- 15 細胞や A.pas 細胞や A.plo 細胞、スイカ由来 Cba-1 細胞、トマト由来 Sly-1 細胞、ハッカ由来 1-Mar 細胞、ニチニチソウ由来 CRA 細胞や V208 細胞や、ハウレンソウ由来 Spi-WT 細胞や Spi-1 細胞や Spi-12F 細胞、ヘチマ由来 Lcy-1 細胞や LcyD6 細胞や LcyD7 細胞や、イネ由来 OS-1 細胞、ツルニチニチソウ由来 Vma-1 細胞、ゴマ由来 PSB 細胞や PSW 細胞や PSG 細胞、ヒャクニチソウ由来 ZE3 細胞などが挙げられる。
- 20 植物体、植物器官又は植物組織を宿主とする場合、形質転換は、採取した植物切片に、アグロバクテリウムのバイナリーベクター法又はパーティクルボンバードメント法によって、あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法によって、(i)ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を挿入した発現用
- 25 組換えベクターを導入し、形質転換の結果得られる腫瘍組織やシュート、毛状根などを分離することにより行われる。

こうして得られる腫瘍組織やシュート、毛状根などは、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能である。また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモンの投与などにより植物体に再生させることができる。

- 30 ヒアルロン酸合成酵素遺伝子が導入された植物細胞から植物を再生させるには、このような植物細胞を、再分化培地、ホルモンフリーのMS培地などに培養すればよい。発根した幼植物体は、土壌に移植して栽培することにより植物体とすることができる。再生(再分化)の方法は植物細胞の種類により異なるが、従来知られている植物組織培養法を適宜用いることができる。

- 例えばイネでは Fujimura ら(Fujimura ら(1995)、Plant Tissue Culture Lett., vol.2:p74)の方法を用
- 35 いることができる。トウモロコシでは、Shillito ら(Shillito ら(1989)、Bio/Technology, vol.7:p581、Gorden-Kamm, 1990, Plant Cell 2, 603)の方法を用いることができる。ジャガイモでは、Visser ら(Visser ら(1989)、Theor.Appl.Genet., vol.78:p589)の方法を用いることができる。タバコでは、Nagata ら(Nagata, 1971, Planta 99, 12)の方法を用いることができる。シロイヌナズナでは Akama ら(Akama ら(1992)、Plant Cell Rep., vol.12:p7)の方法を用いることができる。



これらの方法により作製された植物体、または同じ性質を有するその子孫(繁殖媒体、例えば種子、塊茎、切穂などから得た植物体)も本発明の対象である。

植物内で、ヒアルロン酸合成活性を持つ酵素を発現させ、更に植物内でヒアルロン酸を生産、蓄積または分泌させる際には、植物の適切な組織および器官で特異的に発現するようにヒアルロン酸合成酵素遺伝子を制御することが好ましい。

そのような制御を行うためには組織特異的又は器官特異的プロモーターを更に発現用組み換えベクターに挿入して用いるとよい。

器官特異的プロモーターとしては、例えば、根特異的プロモーター、塊茎特異的プロモーター、葉特異的プロモーター、種子特異的プロモーター、茎特異的プロモーターなどがある。

10 また、組織特異的プロモーターとしては、例えば、緑色組織特異的プロモーターなどがある。

より具体的に、使用し得るプロモーターの例としては、例えば、構成的高発現プロモーターとして、カリフラワーモザイクウイルスの 35SRNA 遺伝子のプロモーターである CaMV35S プロモーター等が挙げられる。緑色組織特異的プロモーターとしては、リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラ

15 ーゼの小サブユニットタンパク質をコードする rbs 遺伝子のプロモーターやクロロフィル a/b 結合タンパク質をコードする CAB 遺伝子のプロモーター、グルセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ A サブユニットタンパク質をコードする GapA 遺伝子プロモーター等が挙げられる。また種子特異的プロモーターとしては、リポキシゲナーゼ遺伝子の LOX プロモーター、レクチン遺伝子の Psl プロモーター、アミラーゼ遺伝子の AmylA プロモーター等が挙げられる。根特異的プロモーターとしては、ヒヨシアミン 6b-ヒドロキラーゼ遺伝子の A6H6H プロモーター、プトレシン N-メチルトランスフ

20 ェラーゼの PMT プロモーター等が挙げられる。茎特異的プロモーターとしては、スクロースシンターゼの Sus4 遺伝子プロモーター、グリコプロテインをコードするパタチン遺伝子プロモーター等が挙げられる。

また、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の発現を誘導性プロモーターで制御することも考えられる。誘導性プロモーターの例を以下に記載する。

25 傷害やサリチル酸の添加により発現が増加する耐病性関連遺伝子プロモーターである PR1a プロモーターや、乾燥、低温、高塩濃度、アブシジン酸の転換より発現が増加する rd29A 遺伝子プロモーター等が挙げられる。農薬として用いられている化合物により発現が誘導されるプロモーターとしては、除草剤のセーフナーにより誘導されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼの 27KDa サブ

30 ユニットタンパク質をコードする GST-27 遺伝子プロモーター、ベンゾ(1,2,3)-チアジアゾール-7-カルボシオイック酸S-メチルエステル(BTH)により誘導されるキチナーゼ遺伝子プロモーターや PR 遺伝子タンパク質プロモーター等がある。さらに、植物細胞内でヒアルロン酸合成遺伝子をより安定に発現させるためにインスレーターの利用や目的の細胞内小器官でヒアルロン酸合成酵素を局在させるためにシグナルペプチドを付加したり、ヒアルロン酸合成酵素の一部を置換および欠損させることなどを行ってもよい。

35 形質転換の対象となる植物体には、遺伝子導入の可能ないずれの植物も包含される。

本発明の植物又は植物体には、被子植物の単子葉植物や双子葉植物、裸子植物等が包含される。このような植物には、任意の有用植物、特に作物植物、蔬菜植物、花卉植物や木本植物が含まれる。

また、本発明の植物又は植物体には、シダ植物、コク植物なども含まれる。

本発明が使用され得る植物種の例としては、具体的には、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科、フトモト科、ヒルガオ科の植物などが挙げられる。

ナス科の植物の例としては、*Nicotiana*, *Solanum*, *Datura*, *Lycopersion*, または *Petunia* に属する植物が挙げられ、例えば、タバコ、ナス、ジャガイモ、トマト、トウガラシ、ペチュニアなどが含まれる。

イネ科の植物の例としては、*Oryza*, *Hordenum*, *Secale*, *Scocharum*, *Echinochloa*, または *Zea* に属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシなどが含まれる。

アブラナ科の植物の例としては、*Raphanus*, *Brassica*, *Arabidopsis*, *Wasabia*, または *Capsella* に属する植物が挙げられ、例えば、大根、アブラナ、シロイヌナズナ、ワサビ、ナズナなどが含まれる。

バラ科の植物の例としては、*Orunus*, *Malus*, *Pynus*, *Fragaria*, または *Rosa* に属する植物が挙げられ、例えば、ウメ、モモ、リンゴ、ナシ、オランダイチゴ、バラなどが含まれる。

マメ科の植物の例としては、*Glycine*, *Vigna*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Vicia*, *Arachis*, *Trifolium*, *Alphalfa*, または *Medicago* に属する植物が挙げられ、例えば、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ソラマメ、ラッカセイ、クローバ、ウマゴヤシなどが含まれる。

ウリ科の植物の例としては、*Luffa*, *Cucurbita*, または *Cucumis* に属する植物が挙げられ、例えば、ヘチマ、カボチャ、キュウリ、メロンなどが含まれる。

シソ科の植物の例としては、*Lavandula*, *Mentha*, または *Perilla* に属する植物が挙げられ、例えば、ラベンダー、ハッカ、シソなどが含まれる。

ユリ科に属する植物の例としては、*Allium*, *Lilium*, または *Tulipa* に属する植物が挙げられ、例えば、ネギ、ニンニク、ユリ、チューリップなどが含まれる。

アカザ科の植物の例としては、*Spinacia* に属する植物が挙げられ、例えば、ホウレンソウなどが含まれる。

セリ科の植物の例としては、*Angelica*, *Daucus*, *Cryptotaenia*, または *Apitum* に属する植物が挙げられ、例えば、シシウド、ニンジン、ミツバ、セロリなどが含まれる。

ヒルガオ科の植物の例としては、*Ipomoea* に属する植物が挙げられ、例えば、サツマイモなどが含まれる。

上記のような形質転換植物と同じ性質を有する子孫、また、それらの器官及び組織も本発明の対象である。

また、本発明には、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物細胞が含まれる。また、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織も含まれる。

ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物細胞は、(i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換することにより得ることができる。

ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物は、ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、

付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換することにより得ることができる。

該形質転換植物細胞又は植物内においては、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子がヒアルロン酸合成活性を持つ酵素として発現される。

- 5 上記のようなヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞又は形質転換植物、或いは、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物細胞或いは形質転換植物を用いることにより、ヒアルロン酸を植物により生産することが可能になる。

該形質転換植物細胞又は形質転換植物により生産されたヒアルロン酸を分離又は取得する方法としては、例えば、以下のような方法が挙げられる。

- 10 上記形質転換植物又は形質転換植物細胞を培養し、植物内にヒアルロン酸を生産させた後、該形質転換植物細胞又は植物から適宜公知の方法によって、ヒアルロン酸を抽出する。

例えば、形質転換植物であれば、乾燥させた植物の葉を粉碎して、適当な有機溶媒により抽出を行う。

- 15 ヒアルロン酸を含む抽出液を濾過後、植物細胞を含まないヒアルロン酸の濾過溶液を得る。この溶液をダイアフィルトレーションによって精製し、低分子量の不純物を除去する。溶解したヒアルロン酸を含む濾過溶液を純水でダイアフィルトレーションし、濾液を連続して捨てることによりヒアルロン酸の分離が可能である。医療用の製品が必要である際には、溶液から核酸を沈殿させるという工程を更に行ってもよい。この工程は、例えば、塩化セチルピリジニウムの第4級アンモニウム化合物等の陽イオン界面活性剤を添加することによって行うことができる。

- 20 本発明により取得されるヒアルロン酸は、化粧品及び医薬品の成分、又はバイオマテリアル素材などの用途に有用に利用できる。具体的には、化粧品の保湿成分、又は、関節炎や慢性リウマチ、火傷や切り傷の治療薬や目薬の成分などとして、有用に利用し得る。

本発明によれば、本来植物で生産されなかったヒアルロン酸が、植物により生産される。本発明によれば、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子が植物内で発現され、更に、植物内でヒアルロン酸が生

- 25 産される。

- 遺伝子組換え技法により、タンパク質を生産するための宿主系としては、現在、遺伝子組換え植物、植物培養細胞、大腸菌、酵母などの微生物、動物細胞培養、遺伝子組換え動物などが利用可能である。しかし、いずれの生産システムにも一長一短があり、目的とする組換えタンパク質の用途および特性、生産量などを考慮して最適なものを選ぶ必要がある。植物以外の生産システムをみると、大腸菌はタンパク質のプロセッシングが起らない、インクルージョンボディ(封入体)を形成する可能性があり、プロテアーゼによる分解が生じるなどの問題がある。酵母などでは糖鎖修飾は起こるが酵母独自の構造である。また、治療用物質を微生物で生産する場合はエンドトキシンの混入などを防ぐために精製コストが非常に高くなる。動物細胞は、細胞の維持管理が困難で、高価な培地を必要とする上に増殖速度も遅いため、大規模生産が難しい。なおかつウイルスやガン遺伝子の混入の危険性がある。遺伝子組換え動物の場合は、維持管理の問題の他に倫理的な問題がある。

- 一方、植物生産システムにおける植物培養細胞や植物は、開発期間が長くなる問題やアルカロイドの課題はあるが、従来の農業生産システムが利用でき、スケールアップが容易なうえに、安価に大量に目的物質を生産することが可能である。また微生物、動物細胞を宿主とした場合に問題になるトキシン、感染性ウイルスの心配もない有望な物質生産系である。

このように、本発明における植物によるヒアルロン酸生産システムは、従来の動物や微生物による生産システムと比べて、安全性が高く、コストやエネルギー負荷も小さく、産業上有利な生産システムとなっている。

- これまで植物生産システムにおいて、動物および微生物由来のタンパク質を発現させても、由来生物が異なる場合、必要な高次構造や糖鎖構造が維持されず、生産されたタンパク質が本来の機能を持たないことも多かった。動物や微生物由来のタンパク質を植物で発現させて、そのタンパク質自体を抽出して利用することは従来行われていたが、本発明のように、植物に動物や微生物由来のタンパク質(酵素)を発現させ、なおかつ植物内で発現している酵素を利用して植物内で物質生産を行った例はほとんどなかった。植物が元来持っている糖鎖の構造を、ヒト由来糖転移酵素を組換えた植物で糖鎖構造を変換した例はあるが、植物が元々生産していた物質である糖質の構造を変化させたものであり、本発明のヒアルロン酸のように植物が全く生産していない物質を生産させた実例は従来になく、しかも、ヒアルロン酸のように2種類の糖が一定の順序で数十個あるいは数百個も連なった高分子の物質を生産した例もない。

- また、ヒアルロン酸合成酵素は、一般的に複数の膜貫通領域および膜結合領域を持っている。ヒアルロン酸合成酵素のように膜結合型タンパク質を、遺伝子を発現させる宿主と異なる由来の遺伝子を発現する場合は、膜貫通領域および膜結合領域が正しい構造を維持できないことが多い。特に、活性型ヒアルロン酸合成酵素は、1つのヒアルロン酸合成酵素と膜に存在するリン脂質であるカルベオリピン約14~18分子とが複合体を形成し、ヒアルロン酸合成酵素活性に影響することなどが示唆されている。よって、本発明のように、植物内で植物が本来有していないヒアルロン酸合成酵素遺伝子が発現し、しかも、ヒアルロン酸を生産できる構造を維持していることは、従来の予想を大きく超えるものである。

このように、本発明におけるヒアルロン酸生産植物は、従来技術からは予測し得ない技術であって、かつ、産業上極めて有利な効果を奏するものである。

発明を実施するための最良の形態

- 以下、実施例を挙げて、本発明をより一層具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されることはない。

#### 実施例

##### 1. クロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成酵素遺伝子の単離

- クロレラウイルスヒアルロン酸合成酵素遺伝子(cvHAS)をPCRにより単離するためにPCRプライマーを作製した。プライマーは、既に明らかにされているクロレラウイルスゲノム配列情報(Kutish et al, 1996, Virology, 223, 303-317) (Li et al, 1995, Virology, 212, 134-150) (Li et al, 1997, Virology, 237, 360-377) (Lu et al, 1995, Virology, 206, 339-352) (Lu et al, 1996, Virology, 216, 102-123) およびクロレラウイルス由来ヒアルロン酸合成遺伝子の同定情報(Graves et al, 1999, virology, 257, 15-23) (DeAngelis et al, 1997, Science, 278, 1800-1803)を参考として設計し、かつ発現ベクターへの導入に必要な制限酵素部位を付加したものを作製した。制限酵素サイトは5'側プライマーにはNdeI部位、3'側プライマーにはXbaI部位を付加した。

5'側プライマー(配列番号3)

5' - GCC GCC GCA TAT GGG TAA AAA TAT AAT CAT AAT GGT TTC G - 3'

3'側プライマー(配列番号4)

- 5' - CTT GCA GTC TAG ATC ACA CAG ACT GAG CAT TGG TAG - 3'

PCRの鋳型には、クロレラウイルス CVHI1 株および CVKA1 株のゲノム DNA(広島大学 先端物質科学研究科 生命分子情報学研究室 山田 隆 教授より譲渡)を用いた。

PCRは、DNAポリメラーゼに KOD <sup>+</sup>plus<sup>®</sup> (東洋紡)を用い、94°C 2分、(94°C 15秒、40°C 30秒、68°C 1分)2サイクル、(94°C 15秒、60°C 30秒、68°C 1分)25サイクルの反応プログラムで行った。得られた PCR断片を、pBluescript II KS (+)(以後 pBSと省略する)の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の開始コドン ATG 部位が NdeI サイトになるように改変した大腸菌発現ベクター(改変 pBS)の NdeI と XbaI 部位に挿入した。挿入された断片を、シーケンサーにより CVHI1 株由来ヒアルロン酸合成酵素遺伝子 cvHAS-HI (配列番号1)および CVKA1 株由来ヒアルロン酸合成酵素遺伝子 cvHAS-KA (配列番号2)の DNA 配列を決定した。

#### 10 2. cvHAS の大腸菌での発現および抽出

cvHAS-HI または cvHAS-KA を含む大腸菌 JM109 を 37°C で一晩培養した培養液を種菌とし、500mL 坂口フラスコに 50mL の LB 培地(0.2%グルコースおよびアンピシリンを含む)と 500  $\mu$  L の種菌を添加し、20°C で約 72 時間培養した。cvHAS の発現誘導のためのイソプロピルチオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノイド(IPTG)は培養開始と同時に添加した。培養終了後、培養液の遠心分離を行うことにより菌体を回収し、30mL のバッファー(20mM トリス緩衝液(pH7.5)、0.2M NaCl、1mM EDTA、1mM ベンズアミジンおよび 1mM 2-メルカプトエタノール(2-ME)を含む)で懸濁した後、フレンチプレスにより菌体を破碎した。破碎液を遠心分離(12,000rpm、20分)し、さらにその上清を超遠心分離( $\times$ 100,000g、1時間)することにより cvHAS を含む膜画分を抽出し、200  $\mu$  L のバッファー(上記と同様)で再溶解し、cvHAS 抽出液とした。

#### 20 3. cvHAS 活性測定

大腸菌で生産された cvHAS 抽出液を用いてヒアルロン酸を *in vitro* で合成し、その反応液中のヒアルロン酸濃度を測定する方法でヒアルロン酸合成酵素活性を表すこととした。In vitro ヒアルロン酸合成は、100mM トリス緩衝液(pH7.0)、40mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM EGTA、20mM 2-ME、0.1% BSA、2mM UDP-GlcA、2mM UDP-GlcNAc、20% glycerol および 10  $\mu$  L の HAS 抽出液を含む全量 50  $\mu$  L に調整した反応液を 37°C で2時間、4時間および 20 時間(O/N)反応させた。反応後、90°C にて3分間加熱し、反応を終了させた。反応液を遠心後、上清をヒアルロン酸の測定に用いた。

ヒアルロン酸の測定は、ヒアルロン酸結合タンパク質によるヒアルロン酸の測定試薬のヒアルロン酸プレート「中外」(富士レビオ)を用いた。

30 ヒアルロン酸プレート「中外」は、ヒアルロン酸結合タンパク質を用いたサンドイッチ結合型ヒアルロン酸定量方法である。マイクロタイタープレート上に固定化したヒアルロン酸結合タンパク質に検体中のヒアルロン酸を結合させた後、酵素標識ヒアルロン酸結合タンパク質を結合させ、サンドイッチを形成させる。引き続き、テトラメチルベンチジン(TMB)および過酸化水素を加えると、標識酵素のペルオキシダーゼの作用で TMB が酸化されて呈色する。反応停止液を添加後、プレートリー

35 ダーで波長 450nm、対照波長 620nm で吸光度を測定(A450)することにより、サンプルのヒアルロン酸濃度が評価できる。

本キットに付属している標準ヒアルロン酸溶液を用いて標準曲線を作製し、サンプル中に含まれているのはサンプルの吸光度からヒアルロン酸を含まない溶液(Mock)の吸光度を引いた値( $\Delta$  A450)を用いてヒアルロン酸濃度を決定し、表1でヒアルロン酸濃度(HA 濃度(ng/ml))として記載した。

40

ヒアルロン酸合成酵素活性の表示においては、合成されたヒアルロン酸量をモルとして表示するために、以下のような計算を行い変換した。ヒアルロン酸プレート「中外」に付随していた標準ヒアルロン酸(濃度 100ng/ml)の吸光度を A として、各サンプルの吸光度を B とすると総反応液量が 50  $\mu$ l であることから、それぞれのヒアルロン酸合成酵素活性は

- 5  $B \times 100 \text{ ng/ml} \div A \times 50 \mu\text{l} \div 1000 = C \text{ ng/反応時間}$   
と算出した。

ヒアルロン酸の構成単位である (GlcA-GlcNAc) の分子量は 398.35 であるので、(GlcA-GlcNAc)<sub>n</sub> の分子量は  $398.5Xn - 18X(n-1)$  で表すことができるので、  
n=10 の場合、(GlcA-GlcNAc)<sub>10</sub> の分子量は

- 10  $398.8X10 - 18X(10-1) = 3821.5 \text{ Da}$  と算出される。

従って、それぞれの反応時間でヒアルロン酸に取り込まれた GlcA の分子数は  
 $C \div 3821.5Xn$  (今回は  $n=10$ )  $X1000 = D \text{ pmol}$   
と算出した。

- また、抽出液のタンパク質濃度は BSA を標準タンパク質として用い、Bio-Rad protein assay  
15 reagent (パイオラッド) により測定した結果を表1でタンパク量として記載した。

またヒアルロン酸合成酵素活性は、ヒアルロン酸抽出液に含まれている 1mgあたりのタンパク質が1時間あたりに合成したヒアルロン酸に取り込まれた GlcA の分子数 (pmol) を計算することにより表1で HA 活性として表示した。

その結果を表1に示す。

- 20 表1において、ヒアルロン酸合成酵素を含まないベクターにより形質転換した大腸菌由来の抽出液を Mock と表した。ストレプトコッカス ピオゲネス由来ヒアルロン酸合成酵素遺伝子を持つベクターにより形質転換した大腸菌由来のヒアルロン酸合成酵素抽出液を spHAS と表した。クロレラウイルス CVKA1 株由来のヒアルロン酸合成酵素を含むベクターにより形質転換した大腸菌由来のヒアルロン酸合成酵素抽出液を cvHAS-KA と表し、2回の反復を行ったのでそれぞれを  
25 cvHAS-KA1 および cvHAS-KA2 と表した。クロレラウイルス CVHI1 株由来のヒアルロン酸合成酵素を含むベクターにより形質転換した大腸菌由来のヒアルロン酸合成酵素抽出液を cvHAS-HI と表し、2回の反復を行ったのでそれぞれを cvHAS-HI1 および cvHAS-HI2 と表した。

- HAS 活性の表現方法は、特開 2000-4886、Itano, N. and Kimata, K. (1996) J. Biol. Chem., 271, 9875-9878、Tlapak-Simmons, V. Let al., (1999) J. Biol. Chem., 274, 4246-4253 等に表現され  
30 た方法と同様である。

表1 cvHAS の大腸菌での発現解析

サンプル	反応時間	A450(Ave)	Δ A450	HA濃度 (ng/ml)	HA濃度 (pmol-GlcA)	タンパク量 (mg/ml)	HA活性(pmol/mg-protein/h)
Mock	2時間	0.035	-	-	-	-	-
	4時間	0.059	-	-	-	-	-
spHAS	2時間	0.062	0.027	14.2	5,312	3.12	851
	4時間	0.122	0.063	33.2	12,395		993
cvHAS-KA1	2時間	0.045	0.010	5.3	1,967	2.31	426
	4時間	0.090	0.031	16.3	6,099		660
	O/N	0.231	0.172	90.5	33,841		732
cvHAS-KA2	2時間	0.045	0.010	5.3	1,967	2.07	475
	4時間	0.080	0.021	11.1	4,132		499
	O/N	0.232	0.173	91.1	34,038		822
cvHAS-HI1	2時間	0.094	0.059	31.1	11,608	1.86	3,120
	4時間	0.150	0.091	47.9	17,904		2,406
	O/N	0.117	0.058	30.5	11,411		1,534
cvHAS-HI2	2時間	0.057	0.022	11.6	4,328	1.72	1,258
	4時間	0.106	0.047	24.7	9,247		1,344
	O/N	0.271	0.212	111.6	41,711		1,213

表1の結果に表されるように、単離した遺伝子がヒアルロン酸合成酵素活性を持つことが確認された。

#### 4. cvHAS 植物発現用ベクターの作製

上記3. で作製し HAS 活性を確認した cvHAS-HI と cvHAS-KA を含むプラスミド DNA を鋳型として、PCR により制限酵素サイトを付加した PCR プライマーを用いて cvHAS-HI と cvHAS-KA 断片を増幅した。PCR プライマーは、5' 側は改変 pBS 上の配列に制限酵素部位 *DraI* を付加させたプライマーを設計し、3' 側は改変 pBS 上のマルチクローニングサイト中の制限酵素サイト部位 *SacI* を含む領域をプライマーとして設計した。

5' 側プライマー (配列番号5) 5' - GTG TGG AAT TTA AAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG - 3'

3' 側プライマー (配列番号6) 5' - GGG CGA ATT GGA GCT CCA CCG CGG - 3'

続いて、植物形質転換用ベクター pBI121 (Jefferson et al., 1987, EMBO J, 6, 3901-3907) へ cvHAS の挿入は、pBI121 を制限酵素 *SmaI* と *SacI* で消化し、挿入する cvHAS は制限酵素 *DraI* と *SacI* で消化し、ライゲーション反応で行った。*SmaI* と *DraI* は切断部位が平滑末端となるので接続が可能である。

以上より、cvHAS-HI を含む pBI121 プラスミド (pBI121cvHI) と cvHAS-KA を含む pBI121 プラスミド (pBI121cvKA) が作製できた。

#### 5. エレクトロポレーションコンピテントセルの作製

エレクトロポレーションコンピテントセルは、アグロバクテリウム LBA4404 (*Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404) 単一コロニーを 5 mL の LB 培地に植菌し、28℃ で 1 晩振盪培養した。この培養液を、500 mL の LB 培地に植菌し、600 nm における濁度が 0.5 になるまで 28℃ で振盪培養した。培養液を遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4℃) により集菌して上清を除去し、菌体を洗浄するため 500 mL の滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4℃) により集菌して上清を除去した。この操作を 2 回繰り返した後、沈殿に 20 mL の冷却した滅菌 10% グリセロール溶液を加えて懸濁し、遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4℃) により集菌して上清を除去した。

沈殿に 3 mL の冷却した滅菌 10% グリセロール溶液を加えて懸濁し、40  $\mu$  L ずつ 1.5 mL 遠心管に分注して、液体窒素で凍結させてから -80°C で保存した。

#### 6. アグロバクテリウム LBA4404 株への pBI121cvHI と pBI121cvKA の導入

pBI121cvHI と pBI121cvKA プラスミド DNA を調製し、アグロバクテリウム LBA4404

#### 5 (Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404) へエレクトロポレーションにより導入した。

A. tumefaciens LBA4404 のエレクトロポレーションコンピテント細胞 40  $\mu$  l に発現プラスミド (200  $\mu$  g/ml) 1  $\mu$  l を混合した懸濁液を、あらかじめ氷中で冷却した電極間距離 1 mm のキューベットに注入し、パルス電場 (1.8 kV, 25  $\mu$  F, 200  $\Omega$ ) を印加した。直ちに SOC500  $\mu$  l を加え、28°C にて 3 時間培養した後、カナマイシンを含む LB プレート培地に塗布し、25°C で 3 日間培養し、pBI121cvHI と

#### 10 pBI121cvKA を含むアグロバクテリウムを得た。

#### 7. pBI121cvHI と pBI121cvKA を含むアグロバクテリウム LBA4404 株によるタバコ培養細胞 (BY-2) の感染

形質転換タバコ培養細胞は、*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2 (以下、BY-2 と表すことがある。Nagata et al, 1981, Mol Gen Genet, 184, 161-165) を使用し、タバコ培養細胞の培養は、

#### 15 Nagata らの方法 (Nagata et al, 1981, Mol Gen Genet, 184, 161-165) に従い、LS (Linsmaier and Skoog) 培地 (Linsmaier and Skoog, 1965, Physiol Plant, 18, 100-127) 中の KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 370 mg/L, thiamine HCl を 1 mg/L に増量し、さらに最終濃度 3% の sucrose および最終濃度 0.2 mg/L の 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を添加した改変 LS 培地で行った。

タバコ培養細胞の形質転換は、基本的に An の方法 (An, 1985, Plant Physiol, 79, 568-570) に  
 20 従った。カナマイシン 50 mg/L を含む 5 mL の LB 培地で 28°C にて 1 晩培養した pBI121cvHI および pBI121cvKA を含むそれぞれのアグロバクテリウム培養液 100  $\mu$  L と、培養 4 日目のタバコ培養細胞懸濁液 4 mL をシャーレに入れてよく混ぜ、25°C で 2 晩、暗所下で静置して共存培養した。アグロバクテリウムを除くため、シャーレの中の培養液を 50 mL の遠心管に移して、さらにカナマイシン 100 mg/L とカルベニシリン 250 mg/L を含む改変 LS 培地を 20 mL 加えて、遠心 (1000 rpm, 4  
 25 分) し、上清を除去した。直ちに、新しい改変 LS 培地 25 mL を入れて遠心 (1000 rpm, 4 分) し、細胞を洗浄した。この操作を 3 回繰り返し、アグロバクテリウムを除いた培養細胞をカナマイシン 100 mg/L、カルベニシリン 250 mg/L の入った改変 LS 寒天培地にまき、25°C で暗黒下に静置して培養した。約 2-3 週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。最後に、カナマイシン 100 mg/L、カルベニシリン 250 mg/L を加えた改変 LS 培地  
 30 30 mL に移し、継代培養を行った。

#### 8. 培養細胞での cvHAS の生産および抽出

改変 LS 培地中で 7 日間培養した BY-2 細胞懸濁液 150 mL を遠心分離 (1000 rpm, 20 分) 行い、細胞と培地に分離した。細胞を 30 mL バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine および 10 mM 2ME を含む) に懸濁し、フレンチプレスにより破碎した。  
 35 破碎液を遠心分離 (12,000 rpm, 20 分) し、さらにその上清を超遠心分離 (x100,000g, 1 時間) することにより cvHAS を含む膜画分を抽出し、300  $\mu$  l バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine および 10 mM 2ME を含む) で再溶解し、cvHAS 抽出液とした。

#### 9. 培養細胞が生産したヒアルロン酸の定量

培養細胞が生産したヒアルロン酸を定量するためのサンプルは、上記の細胞培養後に細胞と分  
 40 離した培地、cvHAS 抽出液およびヒアルロニダーゼで処理した cvHAS 抽出液を用いた。cvHAS-



HIとcvHAS-KAを含む培養細胞それぞれ2株を測定した。細胞と分離した培地は、凍結乾燥により2倍に濃縮した。ヒアルロニダーゼ消化は、ウシ精巣由来ヒアルロニダーゼ(SIGMA)を150mM NaClを含む100mMリン酸バッファー(pH5.3)に100mg/mLの濃度で溶解し、cvHAS抽出液に添加し、37°Cで4時間インキュベートした。それぞれのサンプルを90°Cにて3分間加熱後、遠心分離(12,000rpm、10分)し、ヒアルロン酸の定量に上清を用いた。ヒアルロン酸の定量は、ヒアルロン酸プレート「中外」(富士レビオ)を用いて行った。その結果を表2に示す。

表2において、クロレウウイルス CVKA1株由来のヒアルロン酸合成酵素遺伝子を含むベクターにより形質転換したBY-2由来のサンプルをcvHAS-KAと表し、2回の反復を行い、それぞれをcvHAS-KA1およびcvHAS-KA2と表した。クロレウウイルス CVHI1株由来のヒアルロン酸合成酵素遺伝子を含むベクターにより形質転換したBY-2由来のサンプルをcvHAS-HIと表し、2回の反復を行い、それぞれをcvHAS-HI1およびcvHAS-HI2と表した。ヒアルロン酸プレート「中外」(富士レビオ)に付属していた標準ヒアルロン酸の測定結果を「ヒアルロン酸(スタンダード)」として記載した。( )内の濃度は標準ヒアルロン酸溶液中のヒアルロン酸の濃度を表す。

15

表2 培養細胞生産ヒアルロン酸の定量

サンプル		A450	ヒアルロン酸濃度 (ng/ml)
培地	cvHAS-HI1	0.824	2,035
	cvHAS-HI2	0.672	1,655
	cvHAS-KA1	0.654	1,610
	cvHAS-KA2	0.903	2,233
cvHAS 抽出液	cvHAS-HI1	0.332	805
	cvHAS-HI2	0.300	725
	cvHAS-KA1	0.285	688
	cvHAS-KA2	0.357	868
ヒアルロニダーゼ消化 cvHAS 抽出液	cvHAS-HI1	0.013	-
	cvHAS-HI2	0.013	-
	cvHAS-KA1	0.010	-
	cvHAS-KA2	0.010	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(0ng/ml)		0.010	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(100ng/ml)		0.042	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(200ng/ml)		0.080	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(500ng/ml)		0.187	-

20 表2に示されるように、それぞれのラインの培養細胞がヒアルロン酸を生産していることが確認された。

#### 10. 培養細胞生産 cvHAS の活性測定

植物培養細胞で生産された cvHAS 抽出液を用いてヒアルロン酸を *in vitro* で合成し、その反応液中のヒアルロン酸濃度を測定する方法でヒアルロン酸合成酵素活性を評価した。In vitro ヒアルロン酸合成は、100mM Tris-HCl pH7.0、40mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM EGTA、20mM 2-mercaptoethanol、0.1% BSA、2mM UDP-GlcA、2mM UDP-GlcNAc、20% glycerol および 10  $\mu$ l の HAS 抽出液を含み全量 50  $\mu$ l に調整した反応液を 37°C で 0、2 時間反応させた。反応後、90°C にて 3 分間加熱し、反応を終了させた。反応液を遠心後、上清をヒアルロン酸の測定に用いた。ヒアルロン酸結合タンパク質によるヒアルロン酸の測定には、ヒアルロン酸プレート「中外」(富士レビオ)を用いた。HAS 抽出液のタンパク質濃度は BSA を標準タンパク質として用い、Bio-Rad protein assay reagent (パイオラッド) により測定した。その結果を表3に示す。

10

表3 植物培養細胞生産 cvHAS の活性測定

サンプル	反応時間	A450(Ave)	$\Delta$ A450	HA濃度 (ng/ml)	HA濃度 (pmol-GlcA)	タンパク量 (mg/ml)	HAS活性 (pmol/mg-protein/h)
cvHAS-HI1	0時間	0.332	0.143	358	133,829	24.2	2,765
	2時間	0.475					
cvHAS-HI2	0時間	0.300	0.103	258	96,447	14.8	3,258
	2時間	0.403					
cvHAS-KA1	0時間	0.285	0.190	475	177,567	32.8	2,707
	2時間	0.475					
cvHAS-KA5	0時間	0.357	0.126	315	117,755	25.0	2,355
	2時間	0.483					

表3に示されるように、植物培養細胞で生産された cvHAS は、cvHAS-HI、cvHAS-KA とともにヒアルロン酸合成酵素活性を持つことが明らかになった。他の由来のヒアルロン酸合成酵素でも植物細胞でヒアルロン酸の合成が可能であることが示唆される。

#### 11. 形質転換タバコ培養細胞が生産したヒアルロン酸含有画分の調製

カナマイシン(100mg/L)およびカルベニシリン(250mg/L)を含む改変 LS 培地中で 10 日間培養した形質転換 BY-2 の細胞懸濁液 150mL を遠心分離(1000rpm、20 分)し、上清の培地を回収した。この培地を限外濾過し(amicon YM-10)、約4分の1に濃縮した後、2倍量のエタノールを添加して、析出物を遠心で回収した。析出物を水に溶解し、ヒアルロン酸プレートにより、溶解物中のヒアルロン酸を検出し、ヒアルロン酸含有画分が得られていることを確認した。さらに、このヒアルロン酸含有画分に、150mM NaCl を含む 100mM リン酸緩衝液(pH5.3)に溶解したウシ精巢由来ヒアルロニダーゼ(SIGMA)溶液を等量加え、最終濃度 2kU/ml にて 37°C でヒアルロニダーゼ反応を開始した。一定時間の反応開始後に 95°C にて 20 分間加熱し、反応を停止した。反応液を遠心して得られた上清を HPLC による分析に供した。HPLC は、基本的に Tawada らの方法(Tawada et al, 2002, Glycobiology, 12, 421-426)に従い、アミノカラム YMC-Pack NH<sub>2</sub>(4.6mmx 15cm)を用い、サンプル 50  $\mu$ l を 50°C にて、流速 1ml/min で流し、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を移動相としたグラジェント溶出(20→500mM、30 分)により、生成物を UV(210nm)で検出した。図1は、上述の抽出物のヒアルロニダーゼ処理液の HPLC の測定結果を示す。反応開始1時間後にはヒアルロニダーゼの作用により生成した低分子量ヒアルロン酸混合物と推定される複数の糖のピークが検出された。ヒアルロニダーゼ処理の時間経過と共に、生成した低分子量ヒアルロン酸混合物の分子量は低分子側に移行し、反応開始 24 時間後には、初期の混合物のピークのほとんどは消失し、

最終生成物の4糖および6糖のみが検出された。ヒアルロニダーゼ処理の時間経過と共に見られるこのようなオリゴ糖の生成パターンは、ヒアルロン酸のヒアルロニダーゼ処理と同様の結果であり、BY-2の培地から抽出された画分に高分子量のヒアルロン酸が含有されていることが示された。

- 5 12. pBI121cvHI と pBI121cvKA を含むアグロバクテリウム LBA4404 株によるタバコの感染  
タバコ(*Nicotiana tabacum* SR-1)の形質転換は、アグロバクテリウムを用いるリーフディスク法(山田康之、岡田吉美編、「植物バイオテクノロジーII」、東京化学同人、1991年)に従った。カナマイシン 50mg/L を含む 5mL の LB 培地で 28°C にて 1 晩培養した pBI121cvHI および pBI121cvKA をそれぞれ含むアグロバクテリウムの培養液に、滅菌処理したタバコのリーフディスク
- 10 を 3 分間浸した後、濾紙上で余分な菌体を除去し、MS (Murashige and Skoog) 無機塩 (Murashige and Skoog, 1962, *Physiol Plant*, 15, 473) に 3% スクロース、B5 ビタミン、1mg/L ベンジルアミノプリン、1mg/L ナフタレン酢酸および 0.3% ゲランガムを添加し、pH5.7 に調整した分化培地に静置し、28°C にて 2 日間、暗所で静置した。感染させたリーフディスクを滅菌水で 3 回洗浄し、濾紙上で余分な水分を除去した後、抗生物質としてカナマイシン(100mg/L)およびクラフォラン
- 15 (250mg/L)を含む分化培地に静置し、25°C にて 16 時間光条件下でカルスの形成を誘導した。誘導開始 3 週間後に、形態的に正常なシュートを選び、茎葉を含んだ状態で切り出し、カナマイシン(100mg/L)およびクラフォラン(250mg/L)を含む発根培地(MS 無機塩、3% スクロース、B5 ビタミンおよび 0.3% ゲランガム、pH5.7)に移し、25°C にて 16 時間光条件下で発根を誘導した。2 週間後に発根が認められたシュートを新鮮な発根培地に移し替え、茎葉の生育した複数個のラインが得
- 20 られた。

### 13. 形質転換タバコの生産したヒアルロン酸の定量

- 上述のアグロバクテリウムによる感染で得られた 6 ラインの形質転換タバコの葉約 100mg を 2ml 容チューブに移し、200  $\mu$ l のバッファー (20mM Tris-HCl pH7.5, 0.2M NaCl, 1mM EDTA および 10mM 2ME を含む)を加えて懸濁し、400mg のジルコニアビーズ(直径 2mm)を加えた。ビードスマッ
- 25 ュ(和研薬 BS-12)を用いて、チューブを振とう攪拌処理することにより、タバコの葉を破碎処理した (2,500rpm, 5 分)。破碎処理後の液を遠心し(15,000rpm, 10 分)、上清を粗抽出液として回収した。粗抽出液を水で 10 倍に希釈し、測定サンプルとして用いた。ヒアルロン酸の定量は、ヒアルロン酸プレート「中外」(富士レピオ)を用いて行った。その結果を表 2 に示す。尚、タバコ野生株(wild)および mock(pBI121 で形質転換したタバコ)の葉を用いて同様の破碎処理を行い、比較のサンプルとして用
  - 30 いた。cvHAS 形質転換タバコのうち、cvHAS-KA の 1 ライン(No.2)にはヒアルロン酸が有意に検出されたの結果から、形質転換で得られたタバコ植物体においてもヒアルロン酸が生産されていることが確認された。

表4 形質転換タバコの生産したヒアルロン酸の定量

サンプル	A450	ヒアルロン酸濃度 (ng/ml)
cvHAS-HI3, No.1	0.062	0
cvHAS-HI3, No.2	0.054	0
cvHAS-HI3, No.3	0.054	0
cvHAS-HI3, No.4	0.052	0
cvHAS-KA1, No.1	0.083	0
cvHAS-KA1, No.2	0.780	4,211
Mock	0.068	0
Wild	0.057	0
ヒアルロン酸(スタンダード)(0ng/ml)	0.055	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(20ng/ml)	0.090	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(50ng/ml)	0.254	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(100ng/ml)	0.337	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(200ng/ml)	0.566	-
ヒアルロン酸(スタンダード)(500ng/ml)	0.840	-

## 14. 形質転換タバコにおける cvHAS の転写の確認

- 5 上述のアグロバクテリウムによる感染で得られた6ラインの形質転換タバコの葉からトータル RNA を抽出した。トータル RNA の抽出は、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用い、添付のプロトコールに従った。液体窒素で十分に冷却した乳鉢に約 100mg の葉を移し、液体窒素中で乳棒で粉末状に破碎した。直ちに、1% 2-mercaptoethanol を含む Buffer RFT 450  $\mu$ l に破碎細胞を懸濁し、ボルテックスミキサーで攪拌した。この破碎液を QIAshredder スピニングカラムに移し、遠心
- 10 により、細胞破片の除去とホモジナイズを行った。得られた破碎液の上清に半分量のエタノールを添加し、RNeasy ミニカラムに移した。以後、プロトコールに従い、洗浄および溶出の操作を順次行い、トータル RNA を抽出した。尚、タバコ野生株(wild)および mock(pBI121 で形質転換したタバコ)の葉を用いて同様の破碎処理を行い、比較のサンプルとして用いた。
- 次に、得られたトータル RNA を鋳型として、RT-PCR を行った。1st strand cDNA は、ReverTra Ace-
- 15  $\alpha$ -(東洋紡)を用い、添付のプロトコールに従い、上述の 1  $\mu$ g のトータル RNA および random primer から合成した。1st strand cDNA を鋳型とした PCR は、DNA ポリメラーゼに KOD Dash DNA polymerase(東洋紡)を用い、(95°C 30 秒、59°C 2 秒、74°C 30 秒)30 サイクルの反応プログラムで行った。プライマーとして、5'側プライマー(配列番号3)および 3'側プライマー(配列番号4)を用いた。図2は、RT-PCR の反応液のアガロース電気泳動の結果を示す。cvHAS 形質転換タバコの
- 20 うち、ヒアルロン酸生産能の認められた cvHAS-KA の1ライン(No.2)にのみ、相当サイズの明瞭な増幅バンドが検出され、cvHAS 遺伝子の転写が確認された。

## 請求の範囲

1. (1) (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換する工程、(2) 形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3) 該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を有する、ヒアルロン酸の製造方法。
- 5 2. (1) (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換する工程、(2) 形質転換して得られた形質転換体を生育する工程、(3) 該形質転換体により生産されたヒアルロン酸を分離する工程を有する、ヒアルロン酸の製造方法。
- 10 3. (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞の作製方法。
- 15 4. (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換する工程を有する、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物の作製方法。
- 20 5. 発現用組換えベクターが、(1) (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA 及び(2) 器官特異的又は組織特異的プロモーターを含む発現用組換えベクターであって、得られる形質転換植物が、器官特異的又は組織特異的ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物である、請求項4に記載の方法。
- 25 6. ヒアルロン酸合成酵素が脊椎動物由来又は微生物由来ヒアルロン酸合成酵素である、請求項1～5のいずれかに記載の方法。
7. ヒアルロン酸合成酵素がクロレラウィルス由来ヒアルロン酸合成酵素である請求項1～5のいずれかに記載の方法。
- 30 8. (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換することにより得られるヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物細胞。
- 35 9. (i) ヒアルロン酸合成酵素をコードする DNA 又は (ii) ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換することにより得られる、ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。

10. 植物体が、被子植物、裸子植物、シダ植物及びコケ植物からなる群から選ばれるいずれかの植物体である、請求項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
11. 器官が、根、茎、塊茎、葉、花器、塊根、種子及び茎頂からなる群から選ばれる1種又は2種以上の器官である、請求項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
12. 組織が、表皮、師部、柔組織、木部及び維管束からなる群から選ばれる1種又は2種以上の組織である、請求項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
13. 発現用組換えベクターが、(1) (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNA 及び(2)器官特異的又は組織特異的プロモーターを含む発現用組換えベクターであって、得られる形質転換植物が、器官特異的又は組織特異的ヒアルロン酸生産能を有する形質転換植物である、請求項9に記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
14. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物細胞を形質転換することにより得られる、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物細胞。
15. (i)ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNA 又は(ii)ヒアルロン酸合成酵素のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入され且つヒアルロン酸合成活性を有するポリペプチドをコードするDNA を含む発現用組換えベクターを用いて植物体を形質転換することにより得られる、ヒアルロン酸合成酵素を生産する形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
16. ヒアルロン酸合成酵素が脊椎動物由来又は微生物由来ヒアルロン酸合成酵素である、請求項8又は14に記載の形質転換植物細胞。
17. ヒアルロン酸合成酵素が脊椎動物由来又は微生物由来ヒアルロン酸合成酵素である、請求項9～13、15のいずれかに記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
18. ヒアルロン酸合成酵素がクロレラウィルス由来ヒアルロン酸合成酵素である、請求項8又は14に記載の形質転換植物細胞。
19. ヒアルロン酸合成酵素がクロレラウィルス由来ヒアルロン酸合成酵素である、請求項9～13、15のいずれかに記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織。
20. 請求項8又は14に記載の形質転換植物細胞或いは請求項9～13、15のいずれかに記載の形質転換植物又はそれと同じ性質を有する子孫又はそれらの器官又はそれらの組織によって生産されたヒアルロン酸。

1 / 1  
Fig. 1

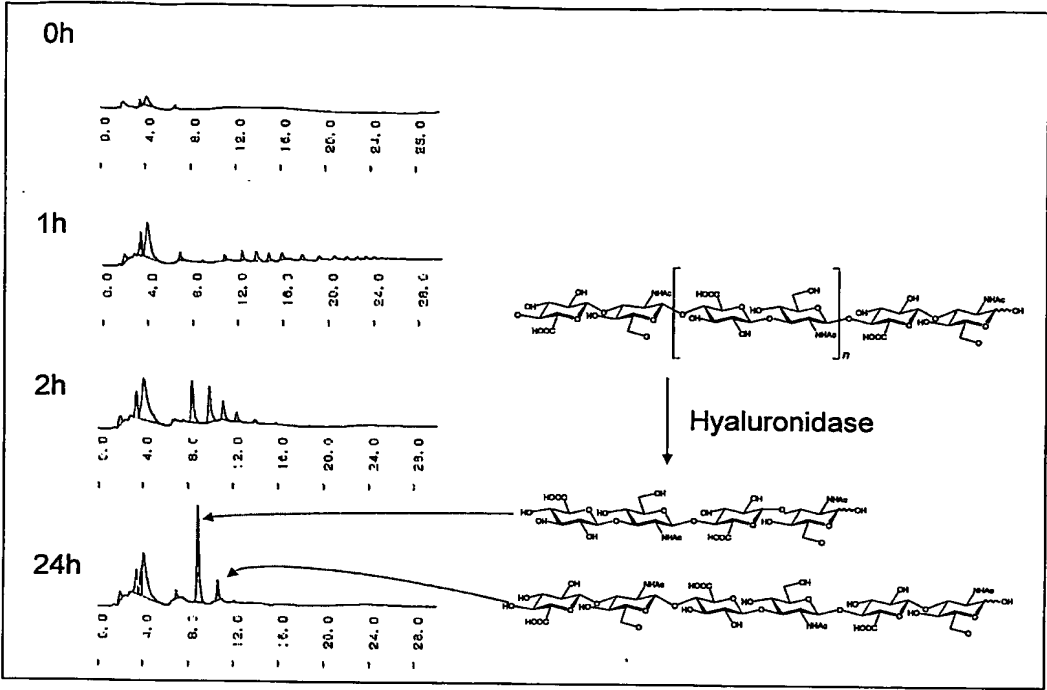
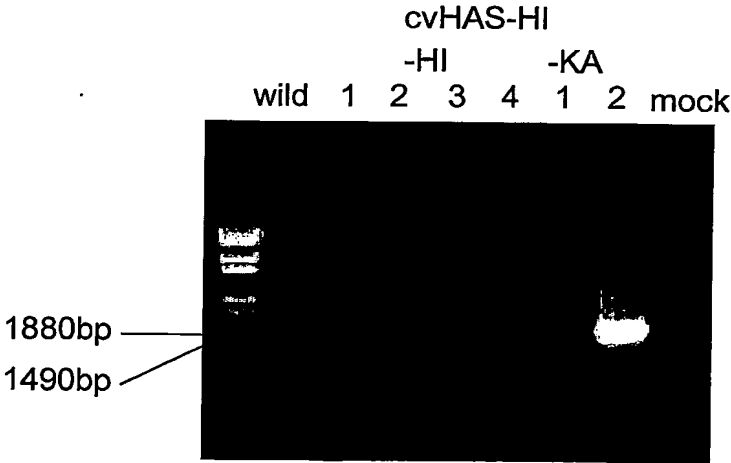


Fig. 2



## SEQUENCE LISTING

<110> TOYOBO RESEARCH CENTER CO., LTD.

<120> Hyaluronic Acid Synthase

<130> P04-78

<150> JP2003-204896

<151> 2003-07-31

<150> JP2004-89135

<151> 2004-03-25

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1707

<212> DNA

<213> Chlorella virus

<400> 1

atgggtaaaa atataatcat aatggtttcg tggtagacca tcataacttc aaatctaate	60
gcggttggag gagcctctct aatcttggct ccagcaatta ctgggtatat tctacattgg	120
aatattgctc tctcgacaat ctggggagta tcagcttatg gtatcttcgt ttttggtttt	180
ttccttgcaac aagttttatt ttcagaactg aacaggaaac gtcttcgcaa gtggatttct	240
ctcagacctc aggggttgaa tgatgtccgt ttggctgtga tcattgctgg ataccgcgaa	300
gatccctata tgttccaaaa gtgtctcgag tcagtgcgtg actctgacta cggtaacgtt	360
gctcgtctca tttgtgttat tgacggcgat gacgacgtg atatgaagat gtccgatgtt	420
tacaagacga tctacaacga taatatcaag aagcccgagt ttgtcttgtg tgagtcagac	480
gacaaggaag gtgaacgcac cgactctgat ttctctcgcg acatttgtgt tctccagcct	540



2/5

caccgtggca agagggagtg tctctatact ggtttccaac ttgcaaagat ggaccccagt 600  
gtcaacgccg tcgttttgat tgacagcgat actgttctcg agaaggatgc tattctggaa 660  
gttgtatacc cacttgcatg cgatcctgag atccaagccg tcgcaggtga gtgtaagatt 720  
tggaacacag acactctttt gagtcttctc gtcgcttgge ggtactattc tgcgttttgt 780  
gtggagagga gtgccagtc ttttttcagg actgttcagt gcgttggggg cccgctgggt 840  
gcctacaaga ttgatatcat taaggagatt aaggaccctt ggatttcca gcgctttctt 900  
ggtcagaagt gtacttacgg tgacgaccgc cggctaacca acgagatctt gatgcgtggg 960  
aaaaaggttg tgttcactcc atttgcgtt ggttggtctg acagtccgac caatgtgttt 1020  
cgatacatcg ttcagcagac ccgctggagt aagtcgtggg gccgcgaaat ttggtacacc 1080  
ctcttcgccg cgtggaagca cgttttgtct ggaatttggc tggccttga atgtttgtat 1140  
caaattacat acttcttctt cgtgatttac ctcttttctc gcctagccgt tgaggccgac 1200  
cctcgctccc agacagccac agtgattgtg agcaccacgg ttgcattgat taagtgtggg 1260  
tatttttcat tccgagccaa ggatattcgg gctttttact ttgtgcttta tacatttggt 1320  
tactttttct gtatgattcc ggccagggtt actgcaatga tgacgcttg ggacattggc 1380  
tgggggtactc gcggtggaaa cgagaagcct tccgttggca cccgggtcgc tctgtgggca 1440  
aagcaatatc tcattgcata tatgtggtgg gccgcggtt ttggcgctgg agtttacagc 1500  
atcgccata actggatgtt cgattggaat tctctttctt atcgttttgc tttggttggg 1560  
atttgttctt acattgtttt tattactatt gtgctggtga tttatttcac cggcaaaatt 1620  
acgacttgga atttcacgaa gcttcagaag gagctaatac aggatcgtgt tctgtacgat 1680  
gcatctacca atgctcagtc tgtgtga 1707

&lt;211&gt; 1707

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Chlorella virus

&lt;400&gt; 2

atgggtaaaa atataatcat aatggtttcg tggtagacca tcataacttc aaatctaatac	60
gcggttggag gagcctctct aatcttggct ccagcaatta ctggatatat tctacattgg	120
aatattgctc tctcgacaat ctggggagta tcagcttatg gtattttcgt ttttggtttt	180
ttccttgcac aagttttatt ttcagaactg aacaggaaac gtcttcgcaa atggatttct	240
ctcagaccta agggttggaa tgatgtccgt ttggctgtga tcattgctgg ataccgcgaa	300
gatccctata tgttccaaaa gtgtctcgag tcagtgcgtg actctgacta cggtaacgtt	360
gctcgtctca tttgtgttat tgacggcgat gacgacgtg atatgaagat gtccgatgtt	420
tacaagacga tctacaacga taatatcaag aagcccgagt ttgtcttgtg tgagtcagac	480
gacaaggaag gtgaacgcat cgactctgat ttctctcgcg acatttgtgt tctccagcct	540
caccgtggca agaggagtg tctctatact ggtttccaac ttgcaaagat ggaccccagt	600
gtcaacgccg tcgttttgat tgacagcgat actgttctcg agaaggatgc tattctggaa	660
gttgtatacc cacttgcatt cgatcctgag atccaagccg tcgcaggtga gtgtaagatt	720
tggaacacag acactctttt gagtcttctc gtcgcttggc ggtactattc tgcgttttgt	780
gtggagagga gtgcccagtc ttttttcagg actgttcagt gcgttggggg cccgctgggt	840
gcctacaaga ttgatcatcat taaggagatt aaggaccctt ggatttccca gcgctttctt	900
ggtcagaagt gtacttacgg tgacgaccgc cggctaacca acgagatctt gatgcgtggt	960
aaaaagggtg tgttcactcc atttgctggt ggttggctctg acagtccgac caatgtgttt	1020
cgatacatcg ttcagcagac ccgctggagt aagtcgtggt gccgcgaaat ttggtacacc	1080
ctctttgccg cgtggaagca cggtttgtct ggaatttggc tggcctttga atgtttgtat	1140

caaattacat acttcttcct cgtgatttac ctcttttctc gcctagccgt tgaagccgac 1200  
cctcgctccc agacagccac agtgattgtg agcaccacgg ttgcattgat taagtgtggg 1260  
tatttttcat tccgagccaa ggatattcgg gctttttact ttgtgcttta tacatttggt 1320  
tactttttct gtatgattcc ggccagggtt actgcaatga tgacgctttg ggacattggc 1380  
tgggggtactc gcggtggaaa cgagaagcct tccgttggca cccgggtcgc tctgtgggca 1440  
aagcaatata tcattgcata tatgtggtgg gccgcggttg ttggcgctgg agtttacagc 1500  
atcgccata actggatggt cgattggaat tctctttctt atcgttttgc tttggttggt 1560  
atttgttctt acattgtttt tattactatt gtgctggtga tttatttcac cggcaaaaatt 1620  
acgacttgga atttcacgaa gcttcagaag gagctaatac aggatcgtgt tctgtacgat 1680  
gcatctacca atgctcagtc tgtgtga 1707

<210> 3  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 3  
gccgccgcac atgggtaaaa atataatcat aatggtttcg 40

<210> 4  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

5/5

&lt;400&gt; 4

cttgcagtct agatcacaca gactgagcat tggtag

36

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 5

gtgtggaatt taaagcggat aacaatttca cacagg

36

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 6

gggcgaattg gagctccacc gcgg

24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/56, C12N5/10, C12P19/04, A01H5/00, C08B37/08, A61K31/728

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/56, C12N5/10, C12P19/04, A01H5/00, C08B37/08, A61K31/728

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Graves M.V. et al., Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae, Virology, 1999, Vol.257, No.1, pages 15 to 23	<u>20</u> 1-19
<u>X</u> Y	DeAngelis P.L. et al., Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1, Science, 1997, Vol.278, No.5344, pages 1800-3	<u>20</u> 1-19
Y	JP 2001-521741 A (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA), 13 November, 2001 (13.11.01)	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 September, 2004 (29.09.04)Date of mailing of the international search report  
12 October, 2004 (12.10.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in the international application as filed

☒ filed together with the international application in computer readable form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

Claims 1, 3, 6 to 8, 14, 16 and 18 relate to a method of producing hyaluronic acid by transforming a plant cell with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the plant cell; claims 2, 4 to 5, 9 to 13, 15, 17 and 19 relate to a method of producing hyaluronic acid by transforming a plant with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the plant; and claim 20 relates to hyaluronic acid.

As the results of the search, however, it is found out that "a method of producing hyaluronic acid by transforming a host with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the host" is not novel because of having been reported in document 'JP 2001-521741 A (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA) 13 November, 2001 (13.11.01), Claims 39 to 41'.

As a result, "a method of producing hyaluronic acid by transforming a host with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the host" falls within the category of prior art and, therefore, the above common matter cannot be referred to as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Thus, there is no matter common to all claims.

Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy in the meaning within PCT Rule 13 can be found out among these groups of inventions differing from each other.

Such being the case, it is obvious that claims 1 to 20 do not comply with the requirement of unity of invention.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2004/011306

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/56, C12N5/10, C12P19/04, A01H5/00, C08B37/08, A61K31/728

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/56, C12N5/10, C12P19/04, A01H5/00, C08B37/08, A61K31/728

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Graves M. V. et al., Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae, Virology, 1999, Vol. 257, No. 1, pages 15-23	20 1-19
X Y	DeAngelis P. L. et al., Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1, Science, 1997, Vol. 278, No. 5344, pages 1800-3	20 1-19
Y	JP 2001-521741 A (ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティー オブ オクラホマ) 2001. 11. 13	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 09. 2004

国際調査報告の発送日

12.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
鈴木 恵理子

4 N 3 1 2 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1、3、6-8、14、16、18は、ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNAを含むベクターを用いて植物細胞を形質転換し、該植物細胞を生育することによるヒアルロン酸の製造方法に関し、請求の範囲2、4-5、9-13、15、17、19は、ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNAを含むベクターを用いて植物体を形質転換し、該植物体を生育することによるヒアルロン酸の製造方法に関し、請求の範囲20は、ヒアルロン酸に関するものである。

しかしながら、調査の結果、「ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNAを含むベクターを用いて宿主を形質転換し、該宿主を生育することによるヒアルロン酸の製造方法」は、文献「JP 2001-521741 A (ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティー オブ オクラホマ) 2001.11.13 請求項39-41」に記載されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、「ヒアルロン酸合成酵素をコードするDNAを含むベクターを用いて宿主を形質転換し、該宿主を生育することによるヒアルロン酸の製造方法」は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、該共通事項は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の意味他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-20は発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである